

PTO/ACT Rec'd 20 FEB 1998

Atty. Docket: 03364.P001
Express Mail #: EM020278310US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Sun-Young Kim, Kee-Won Kim, Tae-Han Kim,
Jeong-Ho Hwang, Seon-Hee Kim and Sun-Young Lee

FOR: HETEROLOGOUS PROTEIN PRODUCTION SYSTEM
USING AVIAN CELLS

09/029042

REQUEST FOR PRIORITY

Hon. Commissioner of
Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

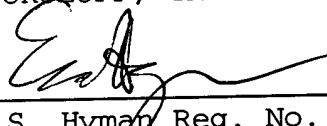
Dear Sir:

Applicant respectfully requests a convention priority for the
above-captioned application, namely Korean Patent Application No.
95-26391 filed on August 24, 1995.

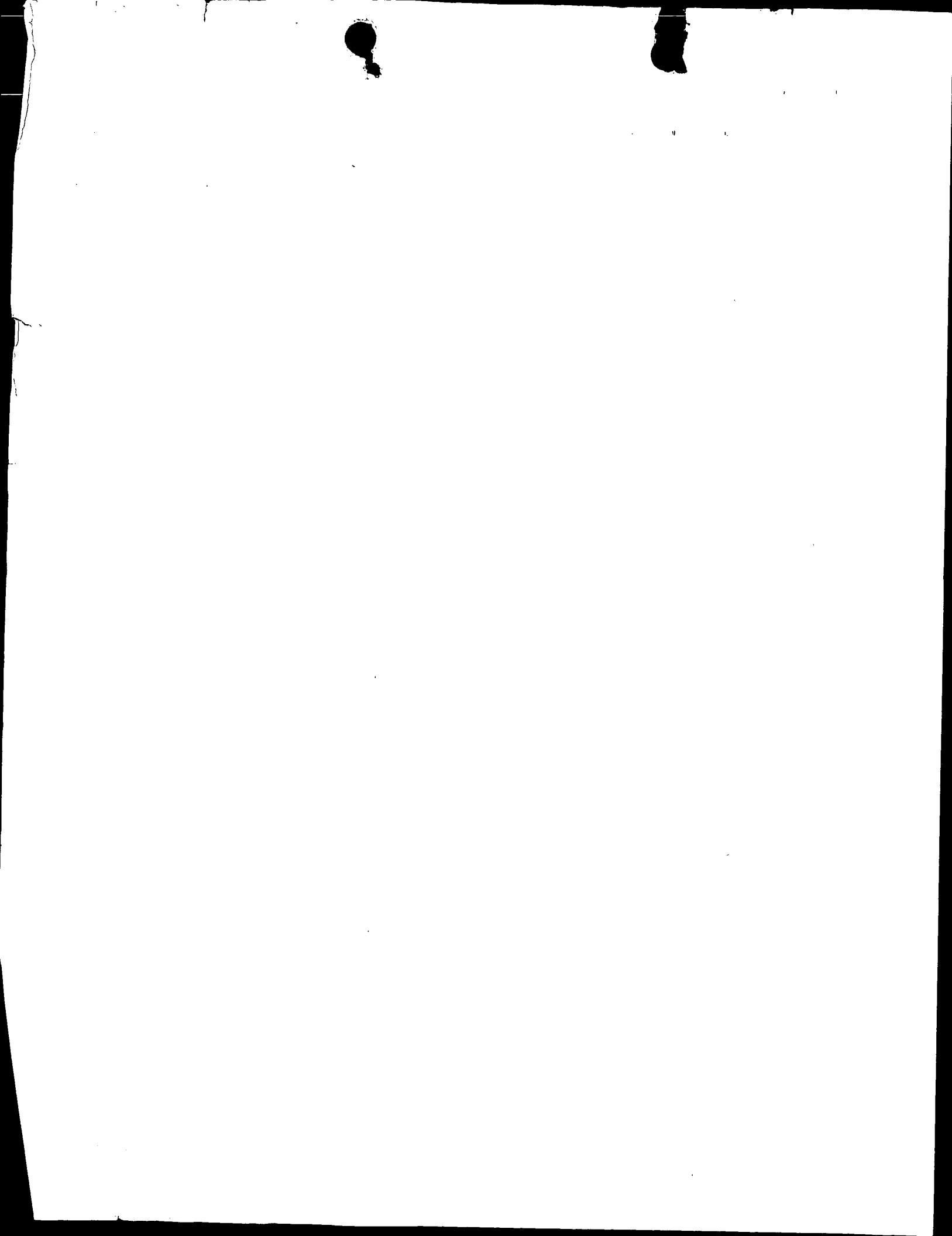
Respectfully submitted,

BLAKELY, SOKOLOFF, TAYLOR & ZAFMAN

Dated: February 20, 1998 By:


Eric S. Hyman Reg. No. 30,139

12400 Wilshire Boulevard
Seventh Floor
Los Angeles, California 90025
(310) 207-3800



09/029,042

PCT/KR 96 / 00145

04. 9. 1996.

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

REC'D 03 OCT 1996

WIPO PCT

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

1995 년 특허출원 제 26391 호

출원번호 :

Application Number

1995 년 8 월 24 일

출원년월일 :

Date of Application

일동제약 주식회사

출원인 :

Applicant(s)

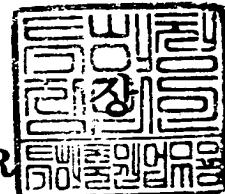
PRIORITY DOCUMENT

6 8 19

199 년 월 일

특허청

COMMISSIONER



정
본

P C 분류 기호	주 분류	방 식 심 사 란	출원번호 :		26391			
	부 분류		담당	심사관	검			
접수 인란	1995. 8. 24	특 허 출 원 서 (심사 청구)						
출 원 인	전명 / 청	일동제약 대표이사	주식회사 윤원영	출원인 코 드	14513840	국적	대한민국	
	주 소	서울특별시 서초구 양재동 60				② 137-130		
대리인	성 명	김 원 재	호	대리인 코드	389-A 137 610-A 386			
	주 소	서울특별시 강남구 역삼동 825-33				전화번호	553-5990	
발명자	성 명	김 선 영	주민등록번호	551103-1074314	국적	대한민국		
	주 소	서울특별시 성동구 금호3가동 두산아파트 109동 1304호						
발명의명칭	오리 배 세포를 이용한 에리스로포이틴의 발현 시스템							
특허법 (제54조 또는 제55조)의 규정에 의한 우선권 주장	출 원 국 명	출 원 의 종 류	출 원 일 자	출 원 번 호	증 명 서 류			
					첨 부	미 첨 부		
특허법 제 42조의 규정에 의하여 위와같이 출원합니다.								
1995년 8월 24일								
대리인 김 원 호								
김 재 만								
특허청장귀하								
특허법 제 60조의 규정에 의하여 위와같이 출원심사를 청구합니다.								
대리인 김 원 호								
김 재 만								
특허청장귀하								
구비서류 : 1. 출원서 부본 2. 명세서, 요약서 및 도면 각 3통 3. 위임장				2통 1통	수 수료			
출원료		기본료	20 면	₩ 20,000				
심사청구료		가산료	32 면	₩ 22,400				
합계		20 항	₩ 398,000					
		₩ 440,400						

명 세 서

1. 발명의 명칭

오리 배 세포를 이용한 에리스로포이틴의 발현 시스템

2. 도면의 간단한 설명

제1도는 조류 세포에서 박테리아 CAT 유전자의 발현을 나타내는 사진이다. 이 때 오리 배 세포(duck embryo cell, 이하 “DE”라 함) 및 닭 배 섬유아 세포(chicken embryo fibroblast cell, 이하 “CEF”라 함)는 CAT 서열을 포함 (+) 또는 포함하지 않는 (-) 발현 벡터로 트랜스펙션시켰다. 이 플라스미드에서 CAT 유전자의 발현은 HCMV(human cytomegalovirus) MIEP(major immediate-earyl promoter)에 의하여 유도된다. CAT 활성은 ^{14}C -클로람페니콜 (C)로부터 생산되는 아세틸화된 클로람페니콜 (AC)의 양을 결정하여 측정하였다. 표기된 수치는 5회 이상의 실험중 대표적인 것으로 나타내었다. 그에 나타난 결과를 얻기 위해서는 10 μg 의 단백질을 ^{14}C -클로람페니콜과 함께 37 °C에서 20 분간 배양하였다.

제2도는 여러 종류의 세포들 및 프로모터들 사이에 CAT 유전자 발현을 비교하여 나타내는 사진이다. 세개의 프로모터-CAT 융합 구조체를 DE, CEF, CHO-K1, HeLa 세포에 트랜스펙션시키고 CAT 활성을 제1도에서처럼 측정하였다. S : SV40 early promoter; C : HCMV MIEP; R : RSV LTR; 표기된 수치는 5회 이상의 실험중 대표적인 것으로 나타내었다. 제2도에 나타낸 결과를 얻기 위해서는 10 µg의 단백질을 ^{14}C -클로람페니콜과 함께 37 °C에서 30 분간 배양하였다.

제3도는 다양한 세포에서 DNA 트랜스펙션의 효율을 나타내는 그래프이다. pCMV-lacZ 구조체를 DE, CHO, Vero, HeLa, 293T 세포에 제2도의 실험에서 사용한 조건을 사용하여 칼슘 포스페이트-DNA 공침전시켜 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션하고 2 내지 3일후 세포를 X-gal로 고정하고 염색하였다. 60 mm 배양 플레이트당 청색 세포의 수를 세었다. 플레이트상에 세포의 총수는 $1\text{-}3 \times 10^5$ 정도로 유사하였다. 트랜스펙션 효율은 DE 세포를 기준으로 상대적으로 계산한 것이다.

제4도는 인체 EPO의 클로닝 및 발현 벡터의 구조에 대한 개략적인 다이어그램이다. 다섯개의 블럭은 EPO의 다섯개 코딩 부위이다. 첫번째 PCR은 프라이머 25 및 33을 사용하여 실시하였다. 증폭된 DNA 절편을

클로닝하여 프라이머 12 및 9를 사용하여 두번째 PCR을 실시하였다.

프라이머 12에서 굴곡선 (wavy tale)은 제일 코딩 부위로부터 뉴클레오티드

서열을 포함한다. 그러므로 두번째 PCR후에는 EPO 전체 코딩 부위가

만들어졌다. 프라이머 12 및 9는 5' 말단후에 Hind III 링커를 포함한다.

이와 같이 증폭되어 클로닝된 EPO DNA는 여러가지 형태의 발현 벡터에서

클로닝되었다.

제5A로부터 제5C도는 본 발명의 일 실시예로서 클로닝되어 사용된 인간
HE-EPO 게놈 DNA의 염기 서열 및 아미노산 서열이다.

제6A로부터 제6C도는 본 발명의 일 실시예로서 클로닝되어 사용된 인간
SHE-EPO 게놈 DNA의 염기 서열 및 아미노산 서열이다.

제7A로부터 제7F도는 본 발명에서 클로닝된 SH-EPO와 HE-EPO 게놈
유전자의 염기서열을 이미 보고된 2개의 EPO 게놈 유전자인 AM-EPO,
GI-EPO 게놈 유전자와 비교하여 나타낸 염기서열이다. AM-EPO를
기준으로 하여 다른 염기는 상자로 표시하였다.

제8도는 본 발명에 따라 클로닝된 SH-EPO와 HE-EPO 단백질의
아미노산 서열을 이미 보고된 2개의 EPO인 AM-EPO, GI-EPO와 비교하여

나타낸 아미노산 서열이다. 다른 아미노산은 상자로 표시하였다.

제9도는 오리 배 세포에서 생산된 EPO를 ELISA 방법과 *in vitro* 바이오어세이(bioassay)에 의하여 측정한 결과를 서로 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

제5도부터 제8도의 상기한 아미노산 서열에서 단문자 표기의 아미노산은 다음과 같다.

A : alanine R: arginine N: asparagine D: aspartic acid

C: cysteine Q: glutamine E: glutamic acid H: histidine

I: isoleucine L: leucine K: lysine M: methionine

F: phenylalanine P: proline S: serine T: threonine

W: tryptophan Y: tyrosine V: valine

3. 발명의 상세한 설명

[산업상 이용분야]

본 발명은 인간의 에리스로포이틴(erythropoietin, 이하 “EPO”라 함)를 비롯한 여러 가지 이종 단백질 (heterologous protein)의 발현 시스템 및 이를 이용한 이종 단백질의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 에리스로포이틴을 코딩하는 게놈과 각종 이종 단백질을 코딩하고 있는 DNA를 오리 배 세포에 삽입하여 에리스로포이틴 및 각종 이종 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[종래 기술]

의약품에 사용되는 많은 재조합 단백질들 중 그 구조가 비교적 작고 간단하면서 생물학적 활성을 갖는 단백질들은 대장균과 같은 원핵생물에서 생산될 수 있다. 그러나 의학적 유용성이 높은 인체 단백질들, 예를 들면, TPA(tissue plasminogen activator), Factor VIII, EPO 등은 생물학적 활성을 나타내기 위해서 단백질 번역 후 수정(posttranslational modification)이라는 과정을 필요로 하기 때문에 이와 같은 과정을 수행하지 못하는

원핵생물에서는 그 생산이 어렵다고 알려져 있다. 예를 들면, EPO는 분자량의 40 %가 탄수화물로 글리코실화가 많이 되어 있는데, 이들 EPO의 탄수화물 부분은 EPO의 생물학적 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 단백질 번역 후 수정을 행하지 못하는 대장균 또는 수정 과정이 약간 다른 효모나 곤충 세포에서 생산된 EPO는 생체내에서 불활성을 나타내거나 또는 매우 미미한 활성만을 나타내지만, 단백질 번역후 수정을 하는 포유 동물 세포인 COS 또는 CHO 세포에서 생산된 EPO는 완전한 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 따라서 의약용으로 현재 생산되는 EPO를 포함한 몇몇 인체 단백질들은 이러한 포유류 동물 세포에서만 생산되어 왔다.

한편 상기한 포유류 세포에서의 유전자 발현 이외에 조류에서의 유전자 발현에 관한 연구도 오랫동안 진행되어 왔다. 예를 들면 종양과 관련된 바이러스로 가장 처음 밝혀진 것들 중의 하나로서 닭의 로우스 사코마(*Rous sarcoma*) 바이러스가 있는바, 이 바이러스에 대한 연구는 레트로바이러스성 온코진(retroviral oncogene)이 세포 유전자로부터 유래한 것임을 밝히고 프로토온코진(protooncogene)이라는 개념을 확정하는 데 결정적 역할을 하였다.

그러나 이들 연구는 바이러스를 조류 또는 조류 배 세포(avian embryo

cells)에서 배양하는 것에 관한 연구로서, 아직까지 고등 진핵 세포의 이종 단백질을 조류 세포에서 발현시키는 것에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다.

[본 발명이 해결하려 하는 과제]

본 발명은 고등 진핵 세포의 단백질을 고효율로 발현시키기 위한 연구로서, 그 목적은 첫째 고등 진핵 세포의 단백질을 고효율로 발현시킬 수 있는 새로운 이종 유전자 발현 시스템을 개발하여 제공하고, 둘째 상기한 이종 유전자 발현 시스템을 이용하여 포유류 동물 세포에서만 생산하여야 생물학적 활성이 있는 것으로 알려진 고등 진핵 세포의 단백질, 예를 들면 TPA, Factor VIII, EPO를 새로운 이종 유전자 발현 시스템을 이용하여 고효율로 생산할 수 있는 방법을 개발하여 제공하고, 셋째 상기한 고등 진핵 세포 단백질중, 특히 EPO를 고효율로 생산할 수 있는 새로운 방법을 개발하여 제공하는 것을 목적으로 한다.

[과제를 해결하기 위한 수단]

상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은; 이종 유전자, 바람직하게는 EPO의 계놈 DNA, 더욱 바람직하게는 특수한 기법으로 클로닝된 EPO의 계놈 DNA와, 조류 세포에서 이종 단백질을 고효율로

생산하는 이종 유전자가 삽입되는 벡터와, 상기 벡터가 발현되는 각종 이종 유전자가 고효율로 발현되는 조류 세포, 바람직하게는 오리 배 세포(duck embryo cell, 이하 "DE"라 함)를 포함하는 이종 유전자 발현 시스템을 제공한다.

즉 본 발명은 바람직하게는 에리스로포이틴에 대한 유전자를 코딩하고 있는 DNA와, 상기 DNA가 삽입되는 벡터와, 상기 벡터가 발현되는 오리 배 세포를 포함하는 에리스로포이틴 생산 시스템을 제공한다.

또 본 발명은 에리스로포이틴 유전자를 코딩하고 있는 DNA를 벡터에 삽입하고, 상기한 벡터를 오리 배 세포에 트랜스펙션하고, 상기 트랜스펙션된 오리 배 세포를 배지에 배양하는 공정을 포함하는 에리스로포이틴의 제조방법을 제공한다.

상기한 본 발명의 에리스로포이틴 발현 시스템 및 에리스로포이틴의 제조방법에 있어서, 상기한 DNA는 에리스로포이틴를 코딩하고 있는 게놈 DNA가 바람직하며, 제5도 또는 제6도에 도시한 서열의 에리스로포이틴를 포함하고 있는 DNA이면 더욱 바람직하다.

그리고 상기한 본 발명의 에리스로포이틴 발현 시스템 및

에리스로포이틴의 제조방법에 있어서, 상기한 벡터는 HCMV의 MIEP를 발현프로모터로 사용하는 벡터가 바람직하다.

또 본 발명은 이종 유전자를 코딩하고 있는 DNA와, 상기 DNA가 삽입되는 벡터와, 상기 벡터가 발현되는 조류 세포를 포함하는 이종 유전자 발현 시스템을 제공한다.

또한 본 발명은 상기한 본 발명의 이종 유전자 발현 시스템을 배지에 배양하여 이종 유전자를 발현시키는 공정을 포함하는 이종 단백질의 제조방법을 제공한다.

그리고 본 발명은 고등 진핵 세포의 이종 유전자를 발현시키기 위한 숙주 세포로서 조류 세포를 제공한다.

또한 고등 진핵 세포의 이종 단백질을 암호화하고 있는 이종 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 조류 세포를 배지에 배양하고, 상기 세포 및 배지로부터 이종 단백질을 분리하는 공정을 포함하는 이종 단백질의 제조방법을 제공한다.

상기한 본 발명의 이종 유전자 발현 시스템 및 상기한 본 발명의 이종

단백질의 제조방법에 있어서, 상기한 이종 유전자는 예를 들면, EPO, TPA, Fcator VIII로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

그리고 상기한 본 발명의 이종 유전자 발현 시스템 및 상기한 본 발명의 이종 단백질의 제조방법에 있어서, 상기한 벡터는 HCMV MIEP를 비롯하여, SV40 초기 프로모터, RSV LTR와 같이 고등진핵세포에서 프로모터 활성이 높은 프로모터 군에서 선택되는 프로모터를 포함하는 벡터인 것이 바람직하다.

그리고 상기한 본 발명의 이종 유전자 발현 시스템 및 상기한 본 발명의 이종 단백질의 제조방법에 있어서, 상기한 조류 세포는 예를 들면, DE, 닭 배 섬유아 세포(chicken embryo fibroblast cell, 이하 "CEF"라 함)로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

그리고 상기한 본 발명의 이종 단백질의 제조방법에 있어서, 상기한 이종 유전자는 이종 단백질의 계놈 DNA, cDNA로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

[실시예]

이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나 하기한 실시예는 본 발명의 이해를 돋기 위한 바람직한 일 실시예일 뿐 본 발명이 하기한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

본 발명자는 조류 세포를 이종 유전자 발현을 위한 숙주 세포로서 사용할 수 있는가에 대한 연구를 실시하였다. 이를 위해서 본 발명자는 하기한 이유로 닭과 오리로부터 배 세포 즉, DE, CEF를 선택하여 사용하였다. 첫째 이들 배 세포는 알로부터 쉽게 제조할 수 있으며, 이들은 간단 신속하게 분리된다. 둘째 닭과 오리 세포는 저렴한 비용으로 대량 배양이 가능하다. 셋째 특정 조류 세포, 예를 들면 닭 배 (chicken embryo)로부터 유래된 세포에서 만들어진 물질들은 이미 오랫동안 의약품으로 사용되고 있다. 예를 들면, 인플루엔자 바이러스에 대한 백신은 계란에서 제조되고 있다. 마지막으로 배양 조건, 배지 및 온도를 포함하여, 조류 배 세포에서 요구되는 조건들은 실질적으로 포유류 세포와 동일하여 이미 개발된 포유류 동물 세포의 배양방법을 큰 변화 없이 사용할 수 있으므로, 기존의 공정을 대체하거나 배양 조건을 최적화하는데 큰 문제가 없다.

I. 사용된 세포와 플라스미드

1. 세포

본 발명에서는 하기한 (표 1)과 같은 세포들을 사용하였다.

(표 1)

HeLa human cervical carcinoma cell	ATCC CCL2
Vero African green monkey kidney cell	ATCC CCL81
SV40의 야생형 T 항원을 형질전환시킨 COS-7 African green monkey kidney cell	ATCC CRL1651
CHO-K1 Chinese hamster ovary cell	ATCC CCL61
NIH3T3 contact-inhibited Swiss mouse embryo cells	ATCC CRL1651
Ad-5 transformed human embryonic kidney cells 293	ATCC CRL1591
SL-29 chicken embryo fibroblast cells	ATCC CRL1590
Duck embryo	ATCC CCL141 또는 직접 제조한 것 사용

상기한 세포들은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10 %

우태 혈청(fetal bovine serum, 이하 "FBS"라 함)을 첨가한 배지에서

배양하였다. 또한 오리 배 세포(duck embryo cell)는 ATCC CCL141을

사용하거나 연구실에서 직접 준비하였다. 이를 위하여는 수정후 10 내지

13일 되는 오리알로부터 배를 분리하여 트립신 처리하여 제조한 것을

사용하였다. 이들 조류 세포들은 비 필수아미노산과 10 % 우태 혈청을 포함하는 염 용액(Earle's balanced salt solution)을 첨가한 최소 배지(Eagle)에서 배양하였다. 이들 세포들은 약 30 회 이상 계대 배양할 수 있었다. 본 발명에서 사용한 각 배지에는 세균에 의한 오염 방지를 위하여 약 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 페니실린 G(Sigma P-3032:1690 units/mg)와 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신 (Sigma S-9137: 750 units/mg)을 첨가하여 사용하였다.

2. 플라스미드

조류 세포에서 이종 단백질 생산 여부와 생산의 효율성을 측정하기 위하여 사용된 CAT 측정 플라스미드로는 Hind III CAT 카세트 (Pharmacia, Piscataway, NJ로부터 구입)를 pRc/RSV 및 pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, California, U.S.A.로부터 구입)에 삽입하여 pRSV-CAT 및 pCMV-CAT를 제조하였다. pSV-CAT는 이미 본 발명자에 의하여 제조된 바 있는 플라스미드 p918을 사용하였다. EPO 생산 벡터로는 두 가지를 사용하였는데, pCMV-gEPO는 EPO 게놈 유전자 서열을 pRc/CMV의 Hind III 부위에 클로닝하여 제조하고, pSV-gEPO는 pSV918의 CAT 서열을 게놈 EPO 서열로 대치하여 제조하였다. 트랜스펙션의 효율을 측정하는데 사용된 pCMV-lacZ는 박테리아의 lacZ 유전자를 pRc/CMV의 Hind III 부위에

삽입하여 제조하였다.

II. 조류 세포에서 DNA 트랜스펙션

본 발명자는 고등 진핵 세포의 이종 유전자의 발현을 위한 숙주로 지금까지 사용되어오던 포유류 세포 대신 조류 세포가 사용 가능한가를 먼저 실험하였다. 지금까지 조류 세포는 바이러스 등의 배양에만 일부 사용되어 오고 있었으며, 고등 진핵 세포의 이종 유전자의 발현의 세포로 보고된 바가 없었다. 이와 같은 실험을 위하여 조류 세포에서 트랜스펙션을 효율적으로 실시하는 방법을 확립하는 것이 필요하다. 즉 세포에서 이종 유전자를 발현시키기 위해서는 DNA를 타겟 세포에 전이시키는 기술의 개발이 필요하다. 현재까지 조류 배 세포에 DNA를 전이하는 기술은 잘 알려져 있지 않다. 이에 따라 본 발명자는 포유류 동물 세포의 경우를 기초로 하여 DNA를 CEF와 DE에 효과적으로 전이하는 방법을 개발하였다.

본 발명자는 사용 가능한 여러 기술 중 칼슘 포스페이트-DNA 공침전 방법을 변형하여 하기한 방법으로 DNA 트랜스펙션을 행하였다. 왜냐하면 이 방법은 여러가지 부착 세포에서 성공적으로 사용되어진바 있고, 영구적인 세포주(stable cell line)를 제조하는데 사용할 수 있기 때문이다. 우리는

다양한 조건으로 실험을 행하였는 바, 하기한 방법이 최적임을 알아냈다.

100 mm 배양 접시에서 세포가 50 - 70 %로 자랐을 때, HBS 완충용액(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.75 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6 mM dextrose, 25 mM HEPES)에 총 10 μg DNA를 세포와 함께 상온에서 30 분간 배양하였다. FBS를 포함하는 일반적인 배지 10 ml을 첨가하고 37 °C에서 20 시간동안 배양하였다. 단 CHO-K1 세포는 8 시간동안 배양하였다. 세포는 100 μM 클로로퀸(chloroquine) 10 ml로 처리한 후 37 °C에서 3 시간동안 배양하였다. 10 ml의 새로운 배지로 교환한 후, 세포를 1 내지 2 일 동안 배양하였다. 배양 상등액을 수집하여 1000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 세포와 파편을 제거하였다. 이들 트랜스펙션 실험에 대한 대조 실험은 트랜스펙션을 하지 않은 세포로부터의 상등액과 EPO 서열을 갖고 있지 않은 플라스미드를 트랜스펙션한 상등액을 사용하여 실시하였다. 트랜스펙션의 효율을 측정하기 위해서는 세포를 pCMV-lacZ으로 트랜스펙션하고 PBS로 1회 세정하고 3 일후 0.5 % 글루탈알데하이드 (PBS내)로 10 분간 고정하고, 1 mM MgCl_2 를 포함하는 4 ml PBS로 각각 2 내지 10 분동안 2회 세정하였다. X-gal 염색을 위해서는 염색용액 [4 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 4 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2 mM MgCl_2 and 400 $\mu\text{g/ml}$ X-gal (dimethylformamide

용액에 녹아 있음)를 포함하는 PBS]을 고정된 세포에 첨가하고, 37 °C에서 4 시간동안 배양하였다. 반응이 완료되면 세포를 PBS로 세정하고 염색된 세포를 PBS에서 유지시켰다.

CAT 활성은 하기한 방법으로 분석하였다.

트랜스펙션을 수행한 2 내지 3 일후 세포를 수확하고, PBS로 1 회 세정하고, 0.25 M Tris-HCl (pH7.5)를 사용하여 부유하였다. 총 단백질은 4회의 냉동과 해동을 반복하고 65 °C에서 7 분동안 배양하였다. 동일한 양의 단백질을 CAT 활성으로 분석하였다. 단백질의 양과 반응시간을 실험에 따라 다양하게 변형시켰다. 예를 들면, DE 세포로부터 준비한 세포 추출물의 CAT 활성은 매우 높아 단 10 µg 단백질과 20 내지 30 분간의 반응 시간만 사용하여도 되었고, 이와 같은 조건하에서 다른 포유류 세포에서의 CAT 활성은 매우 낮거나 미미하였다. CAT 활성이 다른 세포에서 발견될 때면 DE 세포에서는 모든 ¹⁴C-클로람페니콜이 전환되었다. ¹⁴C-클로람페니콜의 아세틸화된 형태로의 전환율은 반응하지 않는 기질과 아세틸화된 형태를 포함하는 부위를 잘라 각각 액체 신틸레이션 측정기로 방사성의 양을 측정하여 결정하였다.

이 때 본 발명자는 프로모터로서 먼저, HCMV의 MIE 부위 (major immediate early region)로부터의 프로모터 (HCMV MEIP)를 선택하여 사용하였다. 왜냐하면 이 프로모터는 여러 종류의 세포에서 고효율의 유전자 발현을 유도하는 것으로 알려져 있기 때문이다. 플라스미드 pCMV-CAT에서, 박테리아 CAT 유전자는 HCMV MIEP의 조절을 받는 위치에 있다. 음성 대조구 (negative control)로서, 프로모터는 있으나 CAT 서열은 포함하지 않는 플라스미드 pRc/CMV를 사용하였다. 이 플라스미드를 DE 및 CEF 세포로 트랜스펙션하고 CAT 활성을 측정하여 트랜스펙션과 유전자 발현의 효율을 측정하였다. 5회 이상 독립적으로 실시한 트랜스펙션으로부터 대표적인 예 하나를 제1도에 도시하였다. 제1도의 제1레인 및 제3레인에서와 같이 대조 플라스미드의 트랜스펙션에서는 두 세포에서 모두 CAT 활성이 나타나지 않았다. 그러나 pCMV-CAT를 트랜스펙션하였을 때에는 두 세포에서 모두 CAT활성이 쉽게 검출되었다. 이외에도 다양한 트랜스펙션 분석을 행한 결과 CEF 세포에서보다 DE 세포에서 항상 CAT 활성이 높은 것으로 나타났다. 이들 두 세포들 사이에 CAT 활성의 차이는 10 내지 50 배의 차이가 났다.

이와 같은 결과는, 조류 세포가 DNA로 쉽게 트랜스펙션되고 이종

유전자가 쉽게 발현될 수 있음을 나타낸다.

III. 조류 세포와 포유류 세포 사이 및 서로 다른 프로모터 사이의 유전자 발현 정도 비교

조류 세포와 포유류 세포에서 발현 효율성을 측정하기 위하여 하기한 세개의 다른 프로모터를 사용하여 조류 세포와 포유류 세포 사이의 유전자 발현을 비교하였다.

(1) SV40 초기 프로모터 (SV40 early promoter)

(2) HCMV MIEP (Human Cytomegalovirus Major Immediate Early Promoter)

(3) RSV LTR (Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeat)

상기한 프로모터는 포유류 세포에서 매우 강력한 것으로 알려져 있으며, 또 종종 고율의 이종 유전자 발현을 위하여 사용되어 왔다.

상기한 프로모터와 CAT 융합 구조체(constructs)를 가지는
플라스미드들을 4개의 다른 세포, DE, CEF, CHO-K1, HeLa에 트랜스페션한
후 CAT 활성을 측정하여 프로모터들 사이 및 세포 사이의 유전자 발현

효율을 비교하였다. 이와 같은 비교를 위하여 모든 트랜스펙션과 CAT 분석은 동시에 같은 조건하에서 실시하였다. 이와 같은 실험 결과의 한 예를 제2도에 도시하였다. 이 예에서 사용된 CAT 효소 측정 조건은, 세포 추출물 10 μ g, 30 분간 37°C에서 반응이다. 이와 같은 특정한 조건하에서, 상기 세개의 프로모터로부터 유래된 CAT 발현 수준은 CHO 및 HeLa 세포에서는 상대적으로 매우 낮거나 미미하였다 (제2도의 제7 내지 12 레인). 매우 많은 양의 단백질을, 예를 들면 80 - 100 μ g을, 보다 긴 반응시간, 예를 들면 90 분, 동안 반응시켜야만 CAT 활성이 감지되었다. 이와 반대로 조류 세포에서는 CAT 활성이 쉽게 검출되었다 (제2도 제1, 2, 3, 5, 6 레인). 다만 SV40 프로모터의 경우에는 CEF 세포에서 CAT 활성이 쉽게 검출되지 않았다 (제2도 제4레인). 이상과 같은 결과로 포유류 세포에서보다 조류 배 세포에서 보다 효율적으로 이종 단백질이 생산됨을 확인하였다.

DE 세포에서는 CAT 활성이 쉽게 검출되었는데 특히 HCMV MIEP는 매우 강력하게 발현을 유도하였다 (제2도 제2레인). 제2도에 사용된 CAT 반응의 조건은 다른 샘플에서도 적당한 CAT 활성을 나타내도록 선택한 것이다. CAT 반응을 제2도의 제2레이에서 사용한 단백질 샘플을 사용하여 제한된 조건(limiting condition)하에서 실시하면 (즉 CAT 전환이 50 %

미만이 되도록 조절하면) 다른 샘플의 CAT 활성은 실질적으로 검출이 되지 않았다. 그러므로 pCMV-CAT으로 트랜스펙션된 DE 세포로부터의 단백질 샘플과 다른 플라스미드들로 혹은 다른 세포들로 트랜스펙션된 것의 샘플들 사이의 CAT 활성의 차이는 적어도 100 배의 차이가 나는 것이다. 이와 같은 결과는 이종 유전자가 DE 세포내에서 특히 HCMV MIEP의 조절하에서 매우 효과적으로 발현됨을 의미한다.

IV. DE 세포에서 높은 유전자의 발현 원인 분석

상기한 실험 (III. 조류 세포와 포유류 세포 사이 및 서로 다른 프로모터 사이의 유전자 발현 정도 비교)에서는 DE 세포에서 이종 단백질, 즉 CAT가 매우 높은 효율로 발현됨을 밝혔는데 이 원인을 분석하기 위하여 하기한 방법을 사용하였다.

먼저 DE 세포에서의 높은 CAT의 발현은 DE 세포를 포함한 조류 세포가 강한 유전자 발현을 유도할 수 있기 때문이기 보다는 세포로의 효과적인 트랜스펙션의 결과일 가능성이 있다. 즉, 트랜스펙션된 세포의 숫자가 많아서 발현량이 높을 가능성이 있는 것이다. 이와 같은 가능성을 확인하기 위하여 본 발명자는 pCMV-lacZ를 DE 및 다른 동물 세포에 트랜스펙션시켰다.

트랜스페션후 세포를 X-gal로 염색하고 청색 세포의 수를 측정하여 트랜스페션 효율을 측정하고 그 결과를 제3도에 도시하였다. 제3도에서 도시한 바와 같이 염색된 세포의 수는 DE 및 다른 동물 세포에서 항상 유사하였다.

따라서 유전자 발현 효율이 조류 세포에서 높은 것은 DE 세포를 포함한 조류 세포에서의 유전자 발현 효율이 포유류 세포에서의 유전자 발현 효율 보다 월등히 높은데 기인함을 나타낸다.

V. 인체 EPO의 클로닝

DE 세포를 실제로 의약적으로 유용한 인체 단백질의 발현에 사용할 수 있는가 여부를 확인하기 위하여 본 발명자는 인체 EPO 유전자를 암호화하고 있는 게놈 DNA를 분리하여 실험하였다. 이 EPO 유전자를 대상으로 한 이유는 이 단백질이 분비형 단백질 (secretion protein)이어서 DE 세포가 이러한 종류의 단백질을 제대로 분비할 수 있는 확인할 수 있기 때문이다. 본 발명자는 EPO의 cDNA 대신 게놈 클론을 사용하였는데, 이는 인체의 유전자가 DE 세포에서 제대로 스플라이징되어 기능을 갖는 mRNA를 생산할 수 있는지를 검토하기 위하여.

EPO 유전자의 클로닝을 위하여 사용된 DNA는 두 사람의 혈액세포로부터 만들어졌다. 헤파린으로 처리한 인체 혈구로부터 인간의 혈액 림포사이트를 Ficoll-Hypaque 구배 원심분리 방법으로 분리하였다. 이로부터 총 DNA를 제조하고 특정 오리고뉴클레오티드 프라이머 (제4도 참조)를 사용하여 하기한 방법에 따라 PCR에 사용하였다. 시작 코돈 주위에는 GC가 매우 많아, 두쌍의 프라이머를 사용하여 이단계 PCR을 실시하여 EPO 서열을 클로닝하였다.

EPO에 대한 계놈 DNA를 얻기 위하여, 전체 세포를 TES (10 mM Tris-HCl pH7.8; 1 mM EDTA; 0.7 % SDS)를 사용하여 분해하고 400 µg/ml 프로티나아제 K로 50 °C에서 1 시간동안 반응시킨 후, 페놀:클로로포름 추출, 에탄올 침전처리하였다. EPO 유전자에 대하여 특이성을 나타내는 오리고뉴클레오티드 프라이머와 전체 계놈 유전자 0.1 µg을 사용하여 PCR을 수행하였다.

프라이머 #25 (sense, 5' to 3') : GAAGCTGATAAGCTGATAACC
프라이머 #33 (antisense, 5' to 3') : TGTGACATCCTTAGATCTCA

이 샘플을 하기한 조건, 즉 92 °C에서 1 분간 변성, 55 °C에서 1분간 프라이머 어닐링, 72 °C에서 1 분간 중합을 30 회 반복하여 증폭하였다. 이와

같은 반응에 의하여 증폭된 DNA 절편들은 N-말단 부위에 처음 13 개 뉴클레오티드를 포함하고 있지 않았다. 그래서 하기한 프라이머를 사용하여 두번째 PCR을 수행하였다 (제4도 참조).

프라이머 #12 (sense, 5' to 3') :

CAAGCTTCGGAGATGGGGGTGCACAATGTCCTGCCTGGCTGTGGC

프라이머 #9 (antisense, 5' to 3') :

CAAGCTTTCATCTGTCCCCCTGTCCTGC

두번째 PCR에 의하여 증폭된 DNA를 pCRII (Invitrogen)에 클로닝하였으며, 증폭된 DNA는 HindIII 자리를 양끝에 갖짐으로 쉽게 다양한 벡터에 삽입할 수 있었다. 본 실험에서는 EPO 게놈 유전자를 HCMV MIEP 또는 SV40 초기 프로모터 (SV40 early promoter)의 조절하에 놓아 각각 pCMV-gEPO 및 pSV-gEPO 등을 제조하였다.

VI. 클로닝된 EPO 유전자의 염기 서열 분석

상기한 방법으로 클로닝된 EPO는 기존의 EPO 게놈 유전자와는 부분적으로 다른 구조를 갖고 있었다. 즉 야생형의 EPO 게놈 유전자에는

5개의 코딩 부위가 존재하며 4개의 인트론들에 의하여 떨어져 위치하고 있다.

그러나 상기한 (V. 인체 EPO의 클로닝) 공정에서 클로닝한 클론은 첫번째

코딩 부위와 두번째 코딩 부위가 밀착하여 한개의 코딩 부위를 형성하고 있어

4개의 코딩 부위와 3개의 인트론으로 형성되어 있다.

상기한 방법으로 클로닝된 2개의 EPO 유전자의 게놈 DNA의 염기서열은

제5도 및 제6도에서 보여지는 바와 같다 (제5A도 내지 제5C도는 이하

"HE-EPO"라 하고, 제6A도 내지 제6C도는 이하 "SH-EPO"라 한다). 이와

같이 본 연구에서 클로닝된 EPO 유전자는 이미 종래에 알려진 두개의 EPO

게놈 DNA(각각 "AM-EPO"와 "GI-EPO"라 함)와 많은 차이점이

있었다(제7도, 제8도 참조). 특히 본 연구를 통하여 클로닝된 EPO 유전자는

3개의 아미노산이 종래의 EPO와 달랐다. HE-EPO는 차이점이 C-말단

부위에 집중되어 있는 반면 SH-EPO는 3개의 차이점이 전 폴리펩타이드에

걸쳐 분포되어 있었다(제8도 참조). 예를 들면, 191개의 EPO 아미노산중

AM-EPO와 GI-EPO는 36번째, 100번째, 170번째 아미노산이 각각 세린,

알라닌, 발린인 반면, SH-EPO는 알자닌, 세린, 타이로신이었다. 또한 기존의

AM-EPO 및 GI-EPO는 170번째, 177번째, 191번째가 각각 발린, 라이신,

알자닌인 반면 HE-EPO는 타이로신, 글루타민산, 글라이신이었다.

VII. DE 세포에서 EPO의 발현

EPO 발현 벡터를 DE, CEF, CHO, HeLa, VERO, 293T를 포함하는 다양한 세포에 트랜스펙션하였다. VERO 세포는 이종 유전자의 발현에 자주 사용되기 때문에 사용하였고, 293T 세포는 DNA 트랜스펙션이 높은 효율로 이루어지고, 아데노바이러스의 E1A, E1B, SV40의 T 항원과 같은 바이러스성 트랜스액티베이터 (transactivator)를 가지고 있어 유전자의 발현이 매우 높기 때문에 사용하였다. 트랜스펙션을 실시하고 2 내지 3 일후, 배양 상등액내의 EPO의 양을 효소 결합 면역흡착 방법 (enzyme linked immunoabsorbent assay)으로 측정하였다 (R & D systems Inc., Catalog number DEP00, Minnesota, U.S.A.). 이와 같은 분석 결과는 하기한 (표 2)에 나타내었다.

(표 2)

(mIU/ml)

세포	HCMV MIEP	SV40 early promoter	HCMV/SV40
293T	314	17.5	18
CHO	139.4	10.4	13.5
VERO	250	10.7	23.5
NIH3T3	89	79.4	1.1
DE	4335	13.8	314.8

상기한 (표 2)에서 알 수 있는 바와 같이 SV40 초기 프로모터를 사용하였을 때 세포들 사이에서 EPO 생산량의 차이는 거의 없었다. 그러나 HCMV MIEP를 사용하였을 때는 DE 세포가 다른 세포들에 비하여 월등히 높은 EPO를 생산하였다. HCMV MIEP는 모든 실험한 세포들에서 SV40 초기 프로모터에 비하여 높은 EPO 수준을 나타냈다. 이와 같은 차이는 특히 DE 세포에서 분명하였는데, 무려 315배나 많은 EPO를 생산하였다. 실험에 사용된 여러 세포 중에서 DE 세포가 항상 가장 많은 양의 EPO를 생산하였다. CHO 세포는 현재 인체에 사용되는 EPO를 생산하는 세포의 모주이다. 그러나 이를 CHO 세포에서 EPO의 수준은 DE 세포에 비하여 적어도 30배가 낮다. 상기한 결과는 인체 EPO가 DE 세포에서 효과적으로 생산되어 방출됨을 의미하며 HCMV MIEP가 DE 세포에서 이종 유전자 발현을 매우 효율적으로 유도할 수 있는 프로모터임을 의미한다.

결론적으로 본 발명자는 DE 세포가 박테리아 및 인체의 유전자를 매우 높은 효율로 발현함을 확인하였다. 사용된 프로모터 모두가 다른 세포에서보다 DE 세포에서 유전자의 고율 발현을 유도하는 것임을 확인하였다. 특히 HCMV MIEP는 DE 세포에서 매우 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다. 이종 유전자의 높은 발현은 트랜스펙션된 세포수가

많기 때문이 아니었다. EPO 계놈 유전자 서열을 포함하고 있는 발현 벡터의 트랜스페션으로 말미암아 배양 상동액에서 많은 양의 EPO를 생산하는 것으로 보아 DE 세포가 스플라히싱 및 분비를 적절히 수행하였음을 알 수 있다.

VIII. 오리 배 세포에서 생산된 EPO의 생물학적 활성

상기한 방법에 따라 오리 배 세포에서 생산된 EPO의 생물학적 역가가 포유류 세포에서 생산된 것과 동일한 것인가를 확인하기 위하여, 하기한 바와 같이 지라세포 생증식 측정 방법을 사용하여 활성을 측정하였다.

먼저 C57BL/6 × C3H의 제1대 잡종 생쥐(F1 hybrid mice)에 폐널하이드라진 60 mg/kg/body/day(대략 1.2 mg/0.1 ml)을 이틀간 주사하고, 마지막 주사일로부터 3일후에 생쥐를 치사하여 지라를 적출하여 100 mesh망에서 PBS를 첨가하여 호모게나이저를 사용하여 균질용액을 얻었다. 상기 균질화된 용액을 림프프렙(lymphoprep: NYCOMED PHARMA AS)에 1:2로 적가하여 2000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상기 원심분리 결과 경계면에 모인 세포를 수확하여 1500 rpm에서 3회 PBS로 세척하고 원심분리하였다. 3회 웰 플레이트에 최종 부피가 4×10^6 cells/ml가 되도록 EPO 대조군 및 샘플을 첨가하여 22시간 배양하였다. 4 uci/l ^{3}H

티미딘으로 처리하고 2 시간 배양한 후 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 PBS로 2회 세정한 후 메탄올로 고정하고 0.3 N NaOH/0.1 % SDS로 세포를 파괴한 후 LSC 용액을 사용하여 세포내의 트리티움양을 측정하였다.

제9도는 인간의 혈액에서 EPO의 농도를 측정하는데 사용되고 있는 키트를 사용하여 ELISA 방법으로 DE에서 생산된 EPO의 농도와 바이오어세이(bioassay)를 통하여 얻어진 EPO의 농도를 비교한 것이다. 바이오어세이시에는 현재 인간에 실제 사용되고 있는 EPO(CILAG AG International)을 대조군(standards)로 사용하였는바, 이는 포유류 동물 세포에서 생산된 것이다. 이 두가지 방법으로 얻어진 EPO 값은 그 비율이 1 ± 0.15였는바, 서로의 값이 매우 유사함을 보여주고 있다. 이는 DE에서 생산된 EPO가 실제 임상에 사용되고 있는 재조합 EPO와 매우 유사한 생물학적 활성을 소지하고 있음을 보여 준다.

그 결과 본 발명의 일 실시예에 따라 오리 배 세포를 이용하여 제조된 EPO는 포유류 동물세포에서 제조된 종래의 EPO와 동일한 역가를 나타내었다.

[효과]

상기한 바와 같이 본 발명은 오리 배 세포 등과 같은 조류 세포가 이종 유전자, 특히 고등 진핵 세포의 이종 단백질, 예를 들면 EPO,에 대한 이종 유전자,를 높은 효율로 발현시키며, 따라서 이러한 조류 세포를 이용할 경우 많은 양의 이종 단백질을 효과적으로 제조할 수 있다.

4. 특허청구의 범위

1. 에리스로포이틴에 대한 유전자를 코딩하고 있는 DNA와;

상기 DNA가 삽입되는 벡터와;

상기 벡터가 발현되는 오리 배 세포를;

포함하는 에리스로포이틴 생산 시스템.

2. 제 1 항에 있어서, 상기한 DNA는 에리스로포이틴을 코딩하고 있는

계놈 DNA인 에리스로포이틴 생산 시스템.

3. 제 1 항에 있어서, 상기한 DNA는 제5도 또는 제6도에 도시한 서열의

에리스로포이틴을 코딩하고 있는 DNA인 에리스로포이틴 생산 시스템.

4. 제 1 항에 있어서, 상기한 벡터는 SV40 초기 프로모터, RSV LTR,

HCMV MIEP로 이루어진 군에서 선택되는 프로모터를 포함하는 벡터인

에리스로포이틴 생산 시스템.

5. 에리스로포이틴 유전자를 코딩하고 있는 DNA를 벡터에 삽입하고;

상기한 벡터를 오리 배 세포에 트랜스펙션하고;

상기 트랜스펙션된 오리 배 세포를 배지에 배양하는;

공정을 포함하는 에리스로포이틴의 제조방법.

6. 제 5 항에 있어서, 상기한 DNA는 에리스로포이틴을 코딩하고 있는
게놈 DNA인 에리스로포이틴의 제조방법.

7. 제 5 항에 있어서, 상기한 DNA는 제5도 또는 제6도에 도시한
에리스로포이틴을 코딩하고 있는 DNA인 에리스로포이틴의 제조방법.

8. 제 5 항에 있어서, 상기한 벡터는 SV40 초기 프로모터, RSV LTR,
HCMV MIEP로 이루어진 군에서 선택되는 프로모터를 포함하는 벡터인
에리스로포이틴의 제조방법.

9. 이종 유전자를 코딩하고 있는 DNA와;

상기 DNA가 삽입되는 벡터와;

상기 벡터가 발현되는 조류 세포를;

포함하는 이종 유전자 발현 시스템.

10. 제 9 항에 있어서, 상기한 이종 유전자는 TPA, Factor VIII, EPO로 이루어진 군에서 선택되는 것인 이종 유전자 발현 시스템.

11. 제 9 항에 있어서, 상기한 벡터는 SV40 초기 프로모터, HCMV MIEP, RSV LTR로 이루어진 군에서 선택되는 프로모터를 포함하는 이종 유전자 발현 시스템.

12. 제 9 항에 있어서, 상기한 조류 세포는 DE, CEF로 이루어진 군에서 선택되는 것인 이종 유전자 발현 시스템.

13. 고등 진핵 세포의 이종 유전자를 발현시키기 위한 수주 세포로서 조류 세포.

14. 제 9 항의 이종 유전자 발현 시스템을 배지에 배양하여 이종 유전자를 발현시키는 공정을 포함하는 이종 단백질의 제조방법.

15. 제 14 항에 있어서, 상기한 이종 유전자는 TPA, Factor III, EPO로 이루어진 군에서 선택되는 것인 이종 단백질의 제조방법.

16. 제 14 항에 있어서, 상기한 벡터는 SV40 초기 프로모터, HCMV MIEP, RSV LTR로 이루어진 군에서 선택되는 프로모터를 포함하는 벡터인 이종 단백질의 제조방법.

17. 제 14 항에 있어서, 상기한 조류 세포는 DE, CEF로 이루어진 군에서 선택되는 것인 이종 단백질의 제조방법.

18. 제 14 항에 있어서, 상기한 이종 유전자는 이종 단백질의 계놈 DNA, cDNA로 이루어진 군에서 선택되는 것인 이종 단백질의 제조방법.

19. 고등 진핵 세포의 이종 단백질을 암호화하고 있는 이종 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 조류 세포를 배지에 배양하고;

상기 세포 및 배지로부터 이종 단백질을 분리하는;

공정을 포함하는 이종 단백질의 제조방법.

20. ~~하기한~~ 서열의 EPO 계놈 유전자.

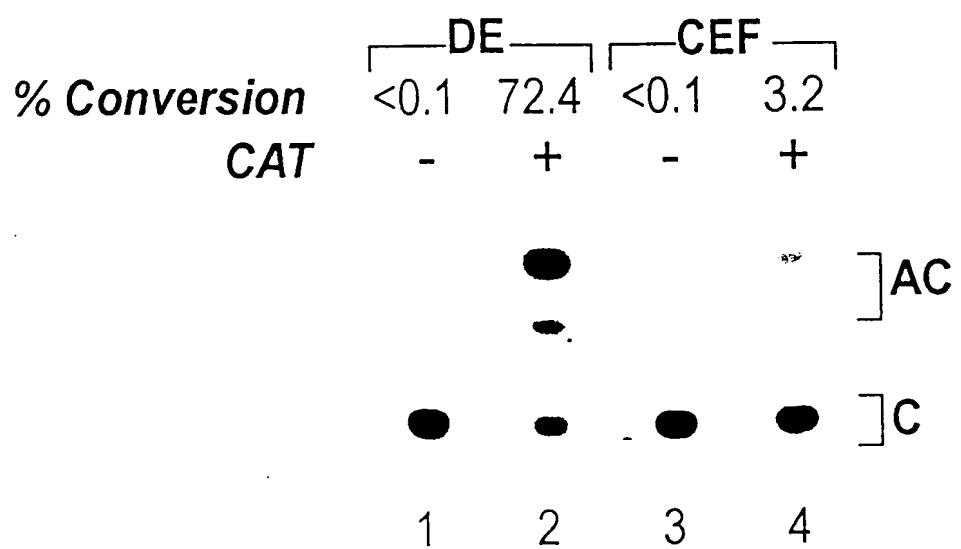
제5도 또는 제6도에 도식한



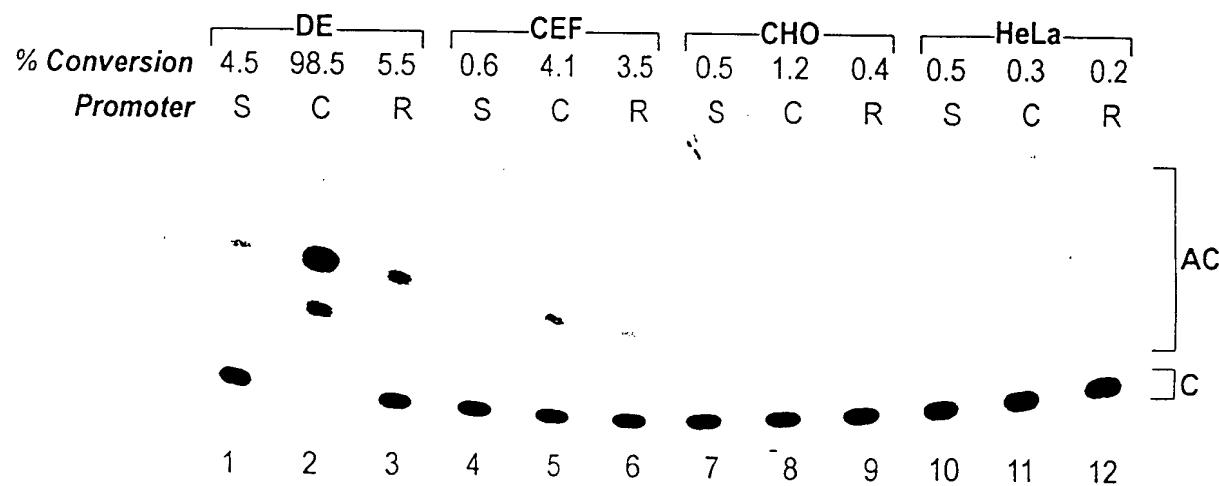
요 약 서

EPO의 게놈 DNA 등의 이종 유전자 DNA와 상기 DNA가 삽입되어 있어 해당 유전자를 고효율로 생산하는 벡터와, 상기 벡터가 발현되는 오리 배 세포와 같은 조류 세포를 포함하는 이종 단백질 발현 시스템을 배양하여 에리스로포이틴과 같은 이종 단백질을 제조할 경우, 이종 단백질을 고효율로 발현시켜 많은 양의 이종 단백질을 효과적으로 생산할 수 있다.

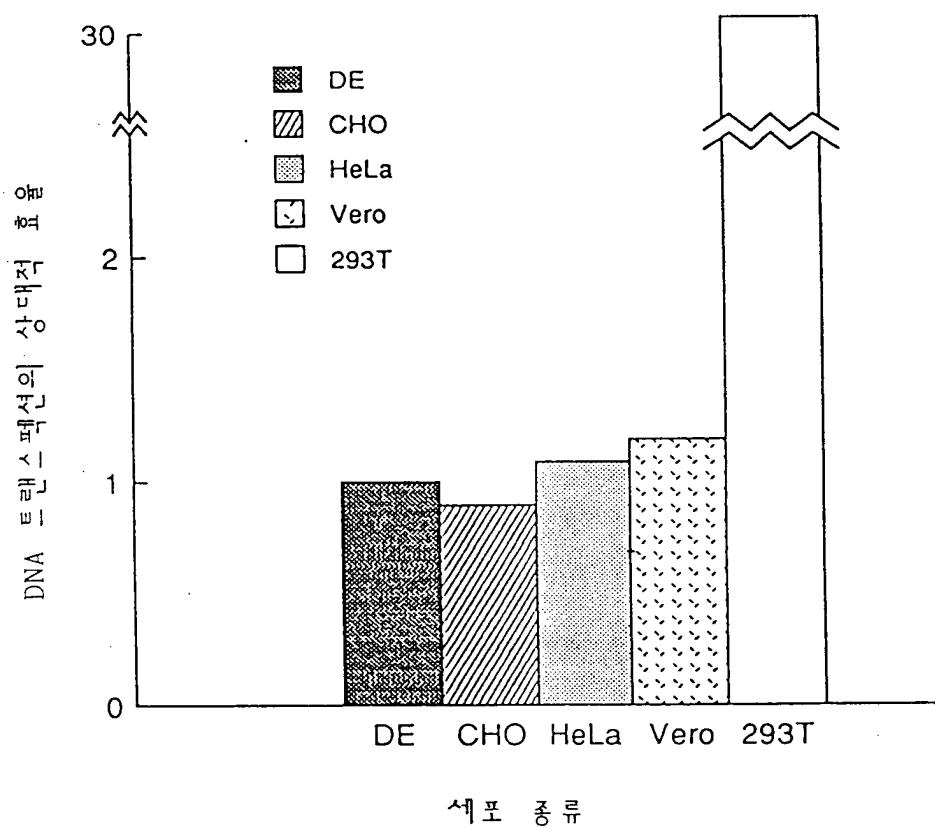
제 1 도



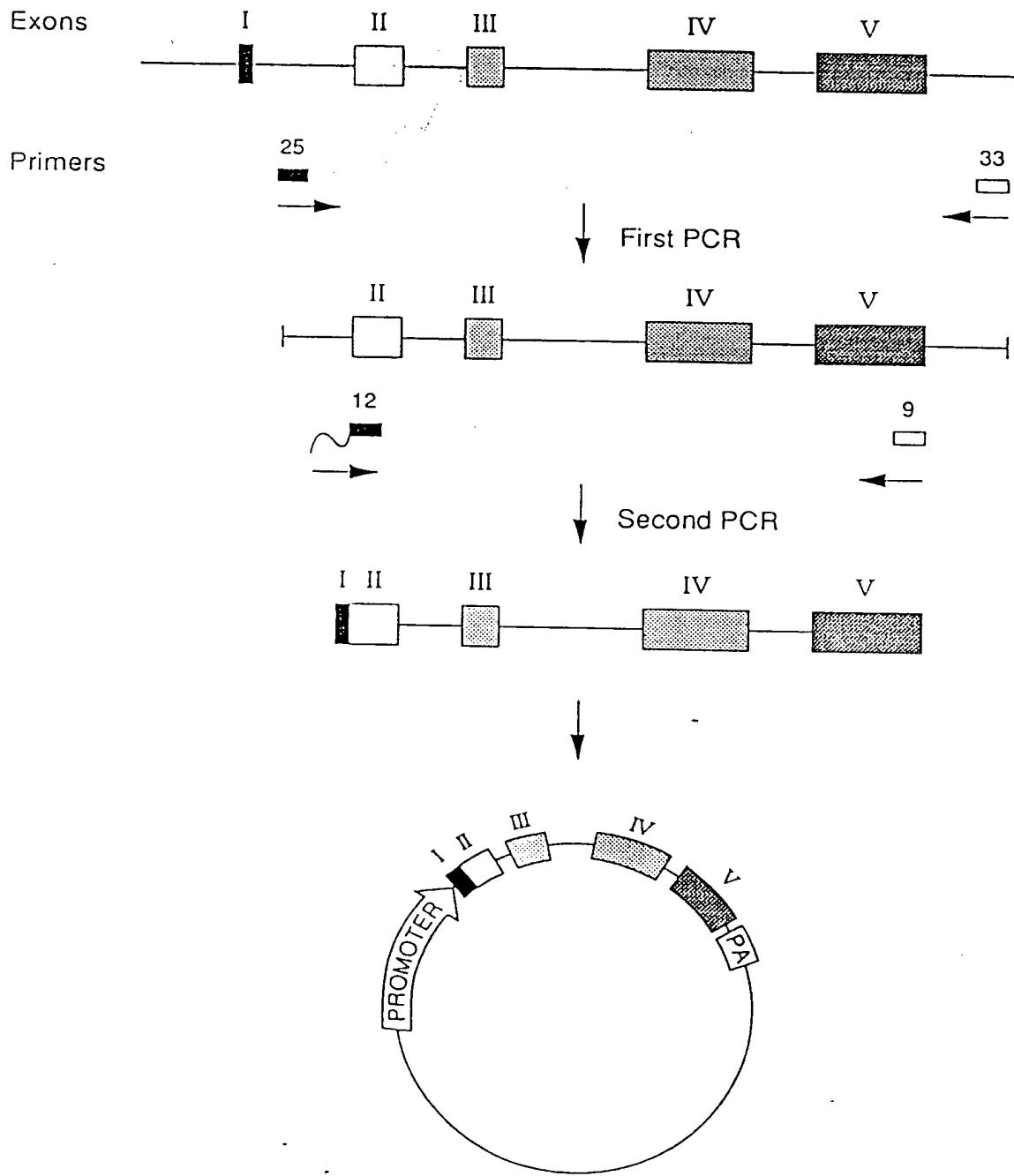
- 제 2 도



제 3 도



III 4 도



제5A도

10	20	30	40											
ATG	GGG	GTG	CAC	GAA	TGT	CCT	GCC	TGG	CTG	TGG	CTT	CTC	CTG	TCC
M	G	V	H	E	C	P	A	W	L	W	L	L	L	S
50	60	70	80	90										
CTG	CTG	TCG	CTC	CCT	CTG	GGC	CTC	CCA	GTC	CTG	GGC	GCC	CCA	CCA
L	L	S	L	P	L	G	L	P	V	L	G	A	P	P
100	110	120	130											
CGC	CTC	ATC	TGT	GAC	AGC	CGA	GTC	CTG	GAG	AGG	TAC	CTC	TTG	GAG
R	L	I	C	D	S	R	V	L	E	R	Y	L	L	E
140	150	160	-- intron --											
GCC	AAG	GAG	GCC	GAG	AAT	ATC	ACG							
A	K	E	A	E	N	I	T							
-- intron --	420	430	440	450										
A	CGG	GCT	GTG	CTG	AAC	ACT	GCA	GCT	TGA	ATG				
T	G	C	A	E	H	C	S	L	N					
460	470	480	490											
AGA	ATA	TCA	CTG	TCC	CAG	ACA	CCA	AAG	TTA	ATT	TCT	ATG	CCT	GGA
E	N	I	T	V	P	D	T	K	V	N	F	Y	A	W

제5B도

500 510 -- intron --

AGA GGA TGG AG
K R M E

-- intron --

1120

GT CGG GCA
V G Q

1130 1140 1150 1160 1170

GCA GGC CGT AGA AGT CTG GCA GGG CCT GGC CCT GCT GTC GGA AGC
Q A V E V W Q G L A L L S E A

1180 1190 1200 1210

TGT CCT GCG GGG CCA GGC CCT GTT GGT CAA CTC TTC CCA GCC GTG
V L R G Q A L L V N S S Q P W

1220 1230 1240 1250 1260

GGA GCC CCT GCA GCT GCA TGT GGA TAA AGC CGT CAG TGG CCT TCG
E P L Q L H V D K A V S G L R

1270 1280 1290 1300

CAG CCT CAC CAC TCT GCT TCG GGC TCT GGG AGC CCA G
S L T I L L R A L G A Q

제5C도

1400 — intron —

1440

AAG GAA GCC
K E A

1450

1460

1470

1480

ATC TCC CCT CCA GAT GCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CGA ACA ATC
I S P P D A A S A A P L R T I

1490

1500

1510

1520

1530

ACT GCT GAC ACT TTC CGC AAA CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC
T A D T F R K L F R V Y S N F

1540

1550

1560

1570

CTC CGG GGA GAG CTG AAG CTG TAC ACA GGG GAG GCC TGC AGG ACA
L R G E L K L Y T G E A C R T

1580

GGG GAC GGA TGA
G D G -

제6A도

10 20 30 40

ATG GGG GTG CAC GAA TGT CCT GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC
M G V H E C P A W L W L L L S

50 60 70 80 90

CTG CTG TCG CTC CCT CTG GGC CTC CCA GTC CTG GGC GCC CCA CCA
L L S L P L G L P V L G A P P

100 110 120 130

CGC CTC ATC TGT GAC AGA CGA GTC CTG GAG AGG TAC CTC TTG GAG
R L I C D R R V L E R Y L L E

140 150 160 --intron --

GCC AAG GAG GCC GAG AAT ATC ACG
A K E A E N I T

410 420 430 440 450

ACG GGC TGT GCT GAA CAC TGC AGC TTG AAT GAG
T G C A E H C S L N E

460 470 480 490

AAT ATC ACT GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT GCC TGG AAG
N I T V P D T K V N F Y A W K

제6B도

500 510 — intron —
| |
AGG ATG GAG
R M E

-- intron -- 1120
|
GTC GGG CAG CAG
V G Q Q

1130 1140 1150 1160 1170
| | | | |
GCC GTA GAA GTC TGG CAG GGC CTG GCC CTG CTG TCG GAA TCT GTC
A V E V W Q G L A L L S E S V

1180 1190 1200 1210
| | | |
CTG CGG GGC CAG GCC CTG TTG GTC AAC TCT TCC CAA CCG TGG GAG
L R G Q A L L V N S S Q P W E

1220 1230 1240 1250 1260
| | | | |
CCC CTG CAG CTG CAT GTG GAT AAA GCC GTC AGT GGC CTT CGC AGC
P L Q L H V D K A V S G L R S

1270 1280 1290 1300
| | | |
CTC ACC ACT CTG CTT CGG GCT CTG GGA GCC CAG
L T T L R A L G A Q

제6C도

-- intron --

1430 1440
| |
AGG AAG CCA TCT
K E A I

1450 1460 1470 1480
| | | |
CCC CTC CAG ATG CGG CCT CAG CTG CTC CAC TCC GAA CAA TCA CTG
S P P D A A S A A P L R T I T

1490 1500 1510 1520 1530
| | | | |
CTG ATA CTT TCC GCA AAC TCT TCC GAG TCT ACT CCA ATT TCC TCC
A D T F R K L F R V Y S N F L

1540 1550 1560 1570
| | | |
GGG GAA AGC TGA AGC TGT ACA CAG GGG AGG CCT GCA GGA CAG GGG
R G K L K L Y T G E A C R T G

1580
|
ACA GAT GAC
D R -

제7A도

AM	ATGGGGGTGCACG (GTGAGT) -----	intron -----
GI	ATGGGGGTGCACG (GTGAGT) -----	intron -----
SH	ATGGGGGTGCACG -----	intron 없음 -----
HE	ATGGGGGTGCACG -----	intron 없음 -----

-----TTCTAG) AATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCT	50
-----TTCTAG) AATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCT	50
-----AATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCT	50
-----AATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCT	50

AM	GTCGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGCGCCCCACCACGCCTCATCT	100
GI	GTCGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGCGCCCCACCACGCCTCATCT	100
SH	GTCGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGCGCCCCACCACGCCTCATCT	100
HE	GTCGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTGGCGCCCCACCACGCCTCATCT	100

AM	GTGACAGCGAGTCCTGGAGAGGTACCTTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAG	150
GI	GTGACAGCGAGTCCTGGAGAGGTACCTTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAG	150
SH	GTGACAGACGAGTCCTGGAGAGGTACCTTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAG	150
HE	GTGACAGCGAGTCCTGGAGAGGTACCTTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAG	150

AM	AATATCACGGTGAGACCCCTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTC	200
GI	AATATCACGGTGAGACCCCTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTC	200
SH	AATATCACGGTGAGACCCCTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTC	200
HE	AATATCACGGTGAGACCCCTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTC	200

AM	AGGGCTTCAGGG AACTCCTCCCAG ATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTT	248
GI	AGGGCTTCAGGG AACTCCTCCCAG ATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTT	248
SH	AGGGCTTCAGGG AACTCCTCCCAG ATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTT	248
HE	AGGGCTTCAGGG AACTCCTCCCAG ATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTT	250

제7B도

AM	GGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCCTACATAAGAATAAGTCT	298
GI	GGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCCTACATAAGAATAAGTCT	298
SH	GGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCCTACATAAGAATAAGTCT	298
HE	GGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCCTACATAAGAATAAGTCT	300
AM	GGTGGCCCCAACCATACCTGAAACTAGGCAAGGAGCAAAGCCAGCAGA	348
GI	GGTGGCCCCAACCATACCTGAAACTAGGCAAGGAGCAAAGCCAGCAGA	348
SH	GGTGGCCCCAACCATACCTGAAACTAGGCAAGGAGCAAAGCCAGCAGA	348
HE	GGTGGCCCCAACCATACCTGAAACTAGGCAAGGAGCAAAGCCAGCAGA	350
AM	TCCTACGGCCTGTGGCCAGGGCCAGAGCCTTCAGGGACCCTTGACTCCC	398
GI	TCCTACG-CCTGTGG-CCAGGGCCAGAGCCTTCAGGGACCCTTGACTCCC	396
SH	TCCTACGGCCTGTGGCCAGGGCCAGAGCCTTCAGGGACCCTTGACTCCC	398
HE	TCCTACGGCCTGTGGCCAGGGCCAGAGCCTTCAGGGACCCTTGACTCCC	400
AM	CGGGCTGTGTGCATTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATG	448
GI	CGGGCTGTGTGCATTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATG	446
SH	CGGGCTGTGTGCATTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATG	448
HE	CGGGCTGTGTGCATTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATG	450
AM	AGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTCTATGCCTGGAAGAGG	498
GI	AGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTCTATGCCTGGAAGAGG	496
SH	AGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTCTATGCCTGGAAGAGG	498
HE	AGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTCTATGCCTGGAAGAGG	500
AM	ATGGAGGTGAGTTCCCTTTTTTTTTTCCTTCTTTGGAGAATCTC	548
GI	ATGGAGGTGAGTTCCCTTTTTTTTTTCCTTCTTTGGAGAATCTC	546
SH	ATGGAGGTGAGTTCCCTTTTTTTTTTCCTTCTTTGGAGAATCTC	546
HE	ATGGAGGTGAGTTCCCTTTTTTTTTTCCTTCTTTGGAGAATCTC	550

제7C도

AM	ATTTCGAGCTGATTGGATGAAAGGGAGAATGATCGGGAAAGGTA	598
GI	ATTTCGAGCTGATTGGATGAAAGGGAGAATGATCGGGAAAGGTA	596
SH	ATTTCGAGCTGATTGGATGAAAGGGAGAATGATCGGGAAAGGTA	596
HE	ATTTCGAGCTGATTGGATGAAAGGGAGAATGATCGGGAAAGGTA	600
AM	AAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGCGCAGAGGCTCACGTCTAT	648
GI	AAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGCGCAGAGGCTCACGTCTAT	646
SH	AAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGCGCAGAGGCTCACGTCTAT	646
HE	AAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGCGCAGAGGCTCACGTCTAT	650
AM	AATCCCAGGCTGAGATGGCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCTGGAGT	698
GI	AATCCCAGGCTGAGATGGCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCTGGAGT	696
SH	AATCCCAGGCTGAGATGGCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCTGGAGT	696
HE	AATCCCAGGCTGAGATGGCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCTGGAGT	700
AM	TTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCATCTCTACAAACATT	748
GI	TTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCATCTCTACAAACATT	746
SH	TTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCATCTCTACAAACATT	746
HE	TTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCATCTCTACAAACATT	750
AM	TAAAAAAATTAGTCAGGTGAAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATT	798
GI	TAAAAAAATTAGTCAGGTGAAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATT	796
SH	TAAAAAAATTAGTCAGGTGAAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATT	796
HE	TAAAAAAATTAGTCAGGTGAAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATT	800
AM	GGAAGGCTGAGGCGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAATTGAGGCTGCAG	848
GI	GGAAGGCTGAGGCGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAATTGAGGCTGCAG	846
SH	GGAAGGCTGAGGCGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAATTGAGGCTGCAG	846
HE	GGAAGGCTGAGGCGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAATTGAGGCTGCAG	850

제7D도

AM	TGAGCTGTGATCACACCACTGCACATCCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCC	898
GI	TGAGCTGTGATCACACCACTGCACATCCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCC	896
SH	TGAGCTGTGATCACACCACTGCACATCCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCC	896
HE	TGAGCTGTGATCACACCACTGCACATCCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCC	900
AM	CTGTCTCAAAAAAGAAAAGAAAAAGAAAAATAATGAGGGCTGTATGGAA	948
GI	CTGTCTCAAAAAAGAAAAGAAAAAGAAAAATAATGAGGGCTGTATGGAA	946
SH	CTGTCTCAAAACGAAAAGAAAAAGAAAAATAATGAGGGCTGTATGGAA	946
HE	CTGTCTCAAAAAAGAAAAGAAAAAGAAAAATAATGAGGGCTGTATGGAA	950
AM	TACATTCAATTCAATTCACTCACTCACTCACTCATTCAATTCAATTCA	998
GI	TACGTTCAATTCAATTCACTCACTCACTCACTCATTCAATTCAATTCA	996
SH	TACATTCAATTCAATTCACTCACTCACTCACTCATTCAATTCAATTCA	996
HE	TACATTCAATTCAATTCACTCACTCACTCACTCATTCAATTCAATTCA	1000
AM	ATTCAACAAGTCTTATTGCATAACCTTCTGTTGCTCAGCTTGGTGCTTGG	1048
GI	ATTCAACATGTCTTATTGCATAACCTTCTGTTGCTCAGCTTGGTGCTTGG	1050
SH	ATTCAACAAGTCTTATTGCATAACCTTCTGTTGCTCAGCTTGGTGCTTGG	1047
HE	ATTCAACAAGTCTTATTGCATAACCTTCTGTTGCTCAGCTTGGTGCTTGG	1048
AM2	GGCTGCTGAGGGGCAGGAGGGAGAGGGTGACATGGGTCACTGACTCCCC	1098
GI2	GGCTGCTGAGGGGCAGGAGGGAGAGGGTGACATGGGTCACTGACTCCCC	1100
SH2	GGCTTCTGAGGGGCAGGAGGGAGAGGGTGACATGGGTCACTGACTCCCC	1197
HE2	GGCTGCTGAGGGGCAGGAGGGAGAGGGTGACATGGGTCACTGACTCCCC	1198
AM2	GAGTCCACTCCCTGTAGGTGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGC	1148
GI2	GAGTCCACTCCCTGTAGGTGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGC	1150
SH2	GAGTCCACTCCCTGTAGGTGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGC	1147
HE2	GAGTCCACTCCCTGTAGGTGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGC	1148

제7E도

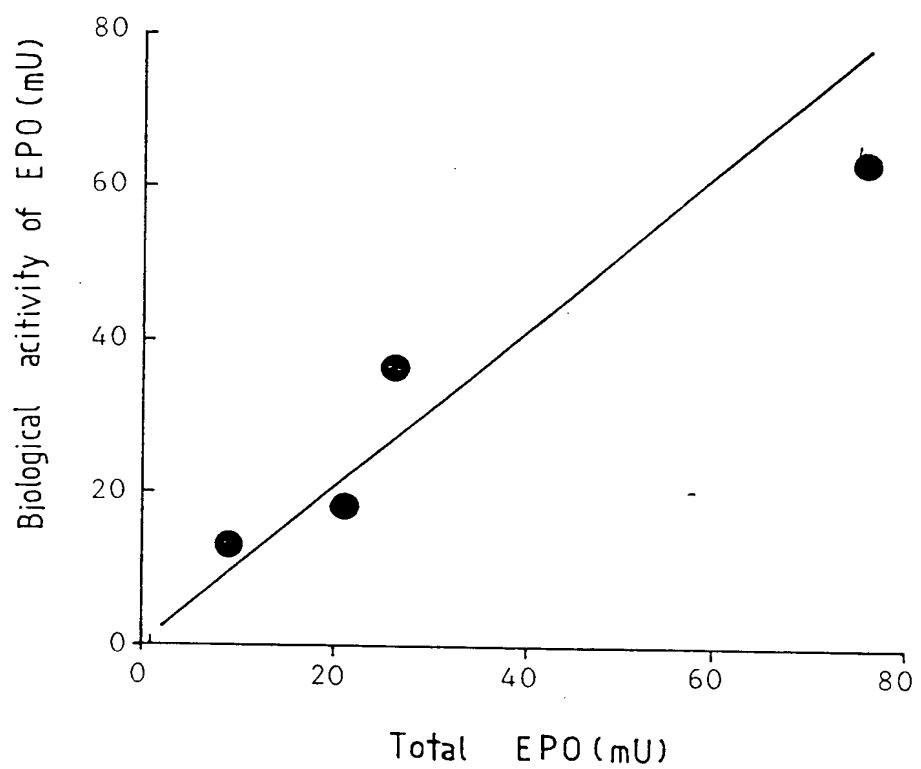
AM	CTGGCCCTGCTGTGGAA <u>G</u> CTGTCTGC GGGG CCAGGCCCTGTGGTCAA	1198
GI	CTGGCCCTGCTGTGGAA <u>G</u> CTGTCTGC GGGG CCAGGCCCTGTGGTCAA	1200
SH	CTGGCCCTGCTGTGGAA <u>G</u> CTGTCTGC GGGG CCAGGCCCTGTGGTCAA	1197
HE	CTGGCCCTGCTGTGGAA <u>G</u> CTGTCTGC GGGG CCAGGCCCTGTGGTCAA	1198
AM	CTCTCCC <u>A</u> GGCGTGGGAGGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCA	1248
GI	CTCTCCC <u>A</u> GGCGTGGGAGGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCA	1250
SH	CTCTCCC <u>A</u> CCGTGGGAGGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCA	1247
HE	CTCTCCC <u>A</u> CCGTGGGAGGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCA	1248
AM	GTGGCCTTC <u>G</u> CAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGGTG	1298
GI	GTGGCCTTC <u>G</u> CAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGGTG	1300
SH	GTGGCCTTC <u>G</u> CAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGGTG	1297
HE	GTGGCCTTC <u>G</u> CAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGGTG	1298
AM	AGTAGGAG <u>G</u> GGACACTCTGCTTGCCTTT <u>T</u> GTAAGAAGGGAGAGAAGGG	1348
GI	AGTAGGAG <u>G</u> GGACACTCTGCTTGCCTTT <u>T</u> GTAAGAAGGGAGAGAAGGG	1350
SH	AGTAGGAG <u>G</u> GGACACTCTGCTTGCCTTT <u>T</u> GTAAGAAGGGAGAGAAGGG	1347
HE	AGTAGGAG <u>G</u> GGACACTCTGCTTGCCTTT <u>T</u> GTAAGAAGGGAGAGAAGGG	1348
AM	TCTTGCTAAGGAGTACAGGA <u>A</u> CTGTCCGTATTCCCTCCCTTGTGGCA	1398
GI	TCTTGCTAAGGAGTACAGGA <u>A</u> CTGTCCGTATTCCCTCCCTTGTGGCA	1400
SH	TCTTGCTAAGGAGTACAGGA <u>A</u> CTGTCCGTATTCCCTCCCTTGTGGCA	1397
HE	TCTTGCTAAGGAGTACAGGA <u>A</u> CTGTCCGTATTCCCTCCCTTGTGGCA	1398
AM	CTGCAGCGAC <u>C</u> TCC <u>T</u> GT <u>TTT</u> CTCC <u>T</u> GGCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTC	1448
GI	CTGCAGCGAC <u>C</u> TCC <u>T</u> GT <u>TTT</u> CTCC <u>T</u> GGCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTC	1450
SH	CTGCAGCGAC <u>C</u> TCC <u>T</u> GT <u>TTT</u> CTCC <u>T</u> GGCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTC	1447
HE	CTGCAGCGAC <u>C</u> ACT <u>T</u> GT <u>TTT</u> CTCC <u>T</u> GGCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTC	1448

제7F도

AM	CAGATCGGGCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGA <u>A</u> ACTTTC	1498
GI	CAGATCGGGCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGA <u>C</u> ACTTTC	1500
SH	CAGATCGGGCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGA <u>T</u> ACTTTC	1497
HE	CAGATCGGGCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGA <u>G</u> ACTTTC	1498
AM	CGCAAACTTTCCGAGTCTACTCCAATTCTCCGGGG <u>A</u> AGCTGAAGCT	1548
GI	CGCAAACTTTCCGAGTCTACTCCAATTCTCCGGGG <u>A</u> AGCTGAAGCT	1550
SH	CGCAAACTTTCCGAGTCTACTCCAATTCTCCGGGG <u>A</u> AGCTGAAGCT	1547
HE	CGCAAACTTTCCGAGTCTACTCCAATTCTCCGGGG <u>G</u> AGCTGAAGCT	1548
AM	GTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGAC <u>A</u> GATGA-	1585
GI	GTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGAC <u>A</u> GATGA-	1587
SH	GTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGAC <u>A</u> GATGA	1585
HE	GTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGAC <u>G</u> GATGA-	1585

제8도

AM/GI	MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAE	50
SH	MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDRRVLRVLEAKEAE	50
HE	MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAE	50
AM/GI	NITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEA	100
SH	NITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSES	100
HE	NITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEA	100
AM/GI	VLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPD	150
SH	VLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPD	150
HE	VLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLLRALGAQKEAISPPD	150
AM/GI	AASAAPLRTITADTFRKLFRV VSNFLRGK LKLYTGEACRTGDR	193
SH	AASAAPLRTITADTFRKLFRV VSNFLRGK LKLYTGEACRTGDR	193
HE	AASAAPLRTITADTFRKLFRV VSNFLRG EKLKYTGEACRTGDR	193

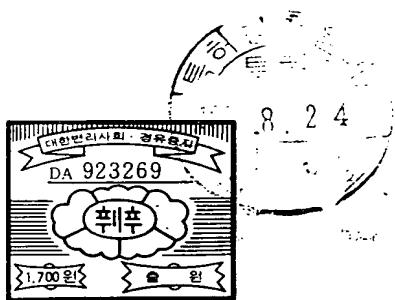


위임장 ·

수 임 자	성 명	김 송 최 김	원 만 현 재	호 석 만	대 리 인 코 드	389-A 137 471-G 022 611-L 131 610-A 386
	주 소	서울특별시 강남구 역삼동 825-33				
사 전 의 표 시		특 허 출 원				
발명 (고안)의 명 칭		오리 배 세포를 이용한 에리스로포이틴의 발현 시스템				
위 임 자	성 명	일 동 제약 주식회사 대표이사 윤 원 영				
	주 소	서 울 특 별 시 서 초 구 양 재 동 60				
	사건과 의 관계	출 원 인				
위임할 사항	1. 상기 사건에 관한 일체의 행위 2. 상기 사건에 관한 변경출원, 분합출원, 명의변경 3. 상기 사건에 관한 취하 및 포기, 또는 특허권의 존속기간의 연장등록 출원의 취하 4. 상기 사건에 관한 이의 신청의 답변 및 거절사정 또는 보정 각하 결정 불복 항고 심판 청구 5. 상기 사건처리에 관한 복대리인의 선임 및 해임 6. 특허법 제55조 규정에 의한 우선권의 주장 또는 그 취하					

특 허 법 제 7 조의 규정에 의하여 위와 같이 위임함.

1995년 8월 2일



위임인 일동제약 주식회사
대표이사 윤원영



